臺灣固氮放線菌在林業上的研究及應用

王維洋
臺灣省林業試驗所

摘　　要

固氮放線菌(*Frankia*)是一類與放線根瘤植物(Actinorhizal plants)根部共生形成根瘤，而可行固氮作用的絲狀細菌(Actinomycetes)，爲普遍存在之土壤微生物，其所共生的寄主全爲木本植物，目前在全世界已知者有８科25屬，超過270種放線根瘤植物。臺灣地區之放線根瘤植物計有五個屬，包括赤楊屬(*Alnus*)，木麻黃屬(*Casuarina*)，馬桑屬(*Coriaria*)，胡頹子屬(*Elaeagnus*)，及楊梅屬(*Myrica*)，共約十餘種灌木及喬木。本研究自全省採集放線根瘤植物，並分離純化其根瘤內之固氮放線菌，共得到71株之純化菌株，分屬於九種宿主植物。本文概略介紹放線根瘤植物之種類、特徵，以及固氮放線菌之分離純化、形態生理特性以及在本省林業上的應用潛力。

關鍵字：固氮放線菌、放線根瘤植物、共生固氮作用

前　　言

固氮放線菌之固氮能力約與豆科植物之根瘤菌相當，對整個地球生態系統而言，其所固定的氮素總量亦不亞於根瘤菌所固定之氮素總量[12，14]。臺灣之林業政策，在近年來，已由生產林木導向，變更爲以生態保育及國土保安爲目的，而放線根瘤植物 (Actinorhizal plants) 在本省爲非常普遍且相當重要的生物固氮資源，對於地表覆蓋以及增進土壤肥力有重要影響。這一類非豆科之固氮植物，其共生固氮之微生物夥伴爲屬於放線菌目(Actinomycetales)之固氮放線菌(*Frankia* spp.)，亦譯爲弗蘭克氏菌[3]或孢囊放線菌[5]。固氮放線菌爲一類具有菌絲(mycelium)、孢子囊(sporangium)、孢子(spore)及囊泡(vesicle)之原核細菌，囊泡爲固氮放線菌特有之構造，爲該菌之固氮作用中心。固氮放線菌爲放線菌中唯一能與雙子葉木本植物根部共生且具固氮能力之一屬，與根瘤菌 (*Rhizobium*) 並爲主要的植物共生固氮細菌。雖然根瘤菌早在十九世紀即已發現，固氮放線菌卻遲至1978年才成功的分離培養並証實其固氮能力[13]，因此在研究上起步較根瘤菌晚了將近一個世紀，此乃因其在人工培養基上生長緩慢，分離時易受雜菌汙染，純化不易所致。

放線根瘤植物的種類

目前已知之放線根瘤植物有8科25屬，超過270種(表一)[15]。臺灣地區之放線根瘤植物計有五個屬，包括赤楊屬(*Alnus*)，木麻黃屬(*Casuarina*)，馬桑屬(*Coriaria*)，胡頹子屬(*Elaeagnus*)，及楊梅屬(*Myrica*)，共約十餘種灌木及喬木[1,2]。台灣赤楊(*Alnus formosana*)爲固有樹種，在本省分佈甚廣，由海拔200公尺至2,500公尺之山地均可生長，屬先驅性樹種，對於山坡裸露地及

崩塌地覆蓋相當重要，亦常生長於公路旁向陽坡面，有穩定坡面之功用。木麻黃類是由澳洲引進之外來樹種，因具有高度之耐鹽性，爲本省主要的海岸防風林造林樹種，分布遍及全省及離島海岸，主要種類包括木賊葉木麻黃(*C. equisetifolia*)、肯氏木麻黃(*C. cunninghamiana*)等，除了可防風定砂，保護海岸之外，其根瘤之固氮作用更可提高海岸砂土肥力，改良土壤以增進其利用價值。台灣馬桑(*Coriaria intermedia*)爲叢生之小灌木，分布於全省河岸、砂地向陽山麓及懸崖斷壁上，其根與種子含有劇毒。胡頹子屬在本省約有９種，屬於不耐陰之直立灌木或攀緣藤本，依種類不同，分布海拔可由海平面至3000公尺高山，多生長於開闊、乾旱及貧脊地區，常見者包括台灣胡頹子(*E. formosana*)、藤胡頹子(*E. glabra*)、鄧氏胡頹子(*E. thunbergii*)等。楊梅屬在本省有兩種，包括特產於恒春港口，喜生長於強風裸露地之恒春楊梅(*M. adenophora* var. *kusanoi*)，及果實可食用之楊梅(*M. rubra*)，楊梅因其不易落葉之特性，林務局視爲防火樹種而將其栽植於森林防火線上。這些放線根瘤植物之所以能在這些土壤貧脊的惡劣環境中生存，主要就在於其根瘤的共生固氮能力，降低了其對環境中養分的需求。

固氮放線菌的分離與蒐集

本省之固氮放線菌研究始自曾顯雄氏針對臺灣赤楊之根瘤解剖學研究及對其根瘤內生菌之分離[25, 26]，其後陸續有其他學者發表相關研究報告[1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 17, 23, 27]。爲了有系統的研究固氮放線菌，林試所進行了兩年的的菌種分離純化與蒐集保存之研究，自本省各縣市及澎湖、金門及馬祖等離島，共計46個地區採集放線根瘤樹種之根瘤，共計333單株進行固氮放線菌之分離(圖一)。放線根瘤植物爲天然林或人工林栽植之固氮樹種，包括台灣赤楊、木賊葉木麻黃、山木麻黃、肯氏木麻黃、銀木麻黃 (*C. glauca*)、台灣馬桑、蓬萊胡頹子(*E. formosensis*)、臺灣胡頹子、藤胡頹子、慈恩胡頹子(*E. grandifolia*)、誼梧(*E. oldhamii*)、菲律賓胡頹子(*E. philippinensis*)、鄧氏胡頹子、恒春楊梅及楊梅等十五種植物。

固氮放線菌之分離方法係採用 Benson 氏法加以修改[1, 2, 12]，採回之新鮮根瘤，先以自來水經超音波震盪，將根瘤表面泥沙沖洗乾淨，再以解剖刀切下當年生之新鮮白色至淡褐色瘤瓣(nodule lobes)，約距頂端２ mm 處切下並置於1.5 ml 之微量離心管中，先以蒸餾水清洗數次，再以95％酒精表面消毒約10 秒鐘，並以無菌水清洗數次後，加入30％ 過氧化氫溶液(內含二至三滴 Tween 20介面活性劑) 浸泡20分鐘，再以無菌水清洗數次。表面消毒之瘤瓣移入已滅菌之組織研磨器(Ten Broeck tissue homogenizer)內，加入數毫升無菌水研磨，磨碎之根瘤懸浮液再以及50mm 及 20mm之雙層尼龍濾網過濾。大部分根瘤細胞內之囊泡團 (Vesicle clusters) 保留於20 mm濾網上，再以１公升之無菌水清洗 20 mm濾網以除去污染雜菌後，將囊泡團以無菌水洗入培養皿內，然後吸取１ml囊泡團懸浮液加入內含5ml BAP缺氮培養液[26]之試管內，於28°C，無光照下培養三至四個月，至試管內有菌絲團長出後，再進行菌種純化步驟。長出菌絲之培養試管，經顯微鏡鑑定確定內含固氮放線菌後，以吸管吸出菌絲團，移入內含十餘粒玻璃珠 (１ mm直徑) 之無菌微量離心管內，經劇烈震盪(vortex) 將菌絲團均質化，再將均質化之懸浮液均勻塗佈於BAP缺氮平板培養基(1.5％ agar) 上，培養一至二個月後，利用解剖顯微鏡在培養基上

挑出隔離之單一固氮放線菌菌落，移入BAP缺氮培養液內培養，以得到純化之固氮放線菌株。純化之菌種每三個月更換一次缺氮培養液進行繼代培養。

固氮放線菌的特性

本研究分離及蒐集本省固有之固氮放線菌種，目前已得到71株的純化菌株。純化菌株之宿主植物包括台灣赤楊等 9 種植物 (表二)，而這些宿主植物之分布則包括台北市等16個縣市 (表三)，具有相當之代表性。由於未長出菌絲或因雜菌汙染，平均每五個所採集到的單株植物之根瘤僅能分離得到一株純化菌株，台灣赤楊及木麻黃根瘤之固氮放線菌較容易分離純化，而胡頹子、楊梅及台灣馬桑之固氮放線菌則較不易分離得到，因此獲得之菌株比例較低。固氮放線菌在缺氮BAP培養液中生長緩慢，在試管內，自分離至長出菌絲約需三個月至一年，再於平板培養基上挑取單菌落培養成純化菌株。純化之菌株多爲白色棉絮狀，少數產生色素而呈淺粉紅色至淺褐色。在顯微鏡下，可見纖細而不具隔膜之菌絲，部分菌株產生孢子囊，形狀不規則，內有多數微細孢子。所有的菌株在缺氮BAP培養液中均產生囊泡(Vesicles)，囊泡呈圓球狀，直徑1至5mm，依不同菌株而異，具厚壁及柄，柄之長度亦有不同，囊泡基部具一隔膜(septa)，爲菌絲中唯一產生隔膜的地方，囊泡爲固氮放線菌之固氮中心[22]。純化之菌株部分經接種台灣赤楊可形成有效性根瘤，固氮效率經乙炔還原法(Acetylene reduction assay)測定，約介於40—1700 nM C_2H_2/g nodule/hr，平均爲508 nM C_2H_2/g nodule/hr，依菌株不同而異 (表四)。接種後植物之生長與未接種之對照組生長差異極大，此點亦與許多研究報告之結論相同[16, 21]。不同菌株對寄主之親合性亦有不同，由木麻黃根瘤分得之菌株接種台灣赤楊，親合性極差，固氮效率亦低。

固氮放線菌的應用潛力

固氮放線菌在本省之應用，大約可分爲三方面，一是藉著放線根瘤樹種生物性固氮作用，來增加林地土壤中氮素含量，以取代林地施用氮肥，增加林地生產力，亦即將固氮植物當做肥料木使用，除此之外，更可利用放線根瘤樹種之快速生長特性，將其與長輪伐期之貴重針葉樹種混植，而在10至20年後砍伐，既可減少林地除草費用，又可提早得到收益，目前已進行之研究包括將台灣赤楊與台灣杉、耳莢相思樹及桉樹等混植，以觀察其效果。二是利用放線根瘤樹種能在脊劣地生長之能力，做爲環境保護之用，例如在崩塌地、廢礦區及海岸邊進行造林，減少環境災害衝擊，亦可利用遺傳工程技術，改變菌株及其宿主植物之基因，使其具有吸收及儲存重金屬能力，在工業區或工業廢水重金屬嚴重汙染之土壤內栽植，以進行植物介質再生作用(phytoremediation)，來挽救因重金屬汙染而帶有毒性之土壤。三是利用固氮放線菌作爲新的固氮基因資源(genetic resources)，利用遺傳工程技術以改良其它非共生固氮性作物，使其具有固氮能力，降低栽培成本。在固氮放線菌中已有許多不同的質體被分離出來[18, 19, 20]，經過改變後可作爲載體(vector)之用。固氮放線菌之固氮基因(*nif* gene)與根瘤菌類似，顯示其亦爲高度保守性之基因，但基因之排列略有不同，可提供對照研究之用[22, 24]。而固氮放線菌之結瘤基因

(*nod* gene)則與根瘤菌明顯不同，值得深入研究。爲達到上述應用目的，在未來對於固氮放線菌的生理、生化及遺傳等基本資料之蒐集與研究應進一步加強。

參考文獻

1. 王維洋，胡曼麗，曾振南，陳兆玫，華傑 1992 建立農業微生物種原庫及種原利用(第五年)-固氮放線菌的蒐集、鑑定、複核與保存(第一報)。食品工業發展研究所研究報告第 693-1 號。
2. 王維洋，胡曼麗，陳志忠，黃莉郁，陳兆玫，華傑 1993 加強農業微生物種原之蒐集、鑑定、保存與篩選(第一年)固氮放線菌的蒐集、鑑定、複核與保存(第二報)。食品工業發展研究所研究報告第 828 號。
3. 蔣建德，楊慧凡，黃家彬，朱寶琴，劉惠昌，鍾玉華，楊碧芳 1984 由四川愷木根瘤中分離和培養弗蘭克氏菌。微生物學報 24:37-40。
4. 李明仁 1986 臺灣赤楊天然林放射菌根瘤生物量及共生固氮作用之季節興變異。中華林學季刊 19:13-23。
5. 杜大至，王毅岩，崔國良 1984 非豆科植物共生固氮的研究 II.沙棘根瘤內生菌的分離與回接。微生物學報 24:41-45。
6. 林慧敏，林良平 1988 根瘤菌胞外多醣體與感染宿主初期的相關性 I. 生長期與碳源及氮源。國立臺灣大學農學院研究報告第28卷第1號
7. 唐盛林，陳正豐 1988 赤楊類固氮菌之簡介。臺灣林業 14(9):36-41。
8. 唐盛林，陳正豐，郭幸榮，楊政川 1990 介紹赤楊類之遺傳改良與固氮作用。臺灣林業 16(11):10-18。
9. 唐盛林，郭幸榮，王維洋 1992 二個產地台灣赤楊根瘤固氮放線菌之分離接種及其固氮活性之比較。中華林學季刊 25:59-72。
10. 郭幸榮，丁慧娟，張建群 1986 木麻黃固氮效率之研究(I)根瘤內生物*Frankia* 之分離。中華林學季刊 19:39-47。
11. 簡岳亭，林良平 1987 臺灣赤楊根瘤之有效固氮菌的形態與生理特性。中國農業化學會誌 25(3):240-250。
12. Benson, D. R. 1988 The genus *Frankia*: actinomycete symbionts of plants. Microbiological Sciences 5:9-12.
13. Callaham, D., P. Del Tredici and J. G. Torrey. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation of *Comptonia*. Science 199:899-902.
14. Dawson, J. O. 1983 Dinitrogen fixation in forest ecosystems. Can. J. Microbiol. 29:979-992.
15. Dawson, J. O. 1992 The use of actinorhizal plants in forestry and agroforestry. In "Proceedings of the 1992 Joint International Symposium on Air Pollution, Soil Microbiology and Biotechnology of Forestry" C. H. Chiang and Y. N. Wang (eds.), Taipei, Taiwan, pp. 177-198.

16. Houwers, A. and A. D. L. Akkermans 1981 Influence of inoculation on yield of *Alnus glutinosa* in the Netherlands. Plant and Soil 61:189-202.

17. Lin, L. P. 1992 The ecological significance of *Frankia* isolates from *Alnus formosana* root nodules in northern Taiwan. In "Proceedings of the 1992 Joint International Symposium on Air Pollution, Soil Microbiology and Biotechnology of Forestry" C. H. Chiang and Y. N. Wang (eds.), Taipei, Taiwan, pp. 199-213

18. Normand, P., P. Simonet, J. L. Butour, C. Rosenberg, A. Moiroud, and M. Lalonde, 1983. Plasmids in *Frankia* sp. J. Bacteriol. 155:32-35.

19. Normand, P., J. A. Downie, A. W. B. Johnston, T. Kieser, and M. Lalonde, 1985. Cloning of a multicopy plasmid from the actinorhizal nitrogen-fixing bacterium *Frankia* sp. and determination of its restriction map. Gene 34:367-370.

20. Normand, P. and M. Lalonde. 1986. The genetics of actinorhizal *Frankia* : a review. Plant and soil 90:429-453.

21. Prat, D. 1992 Effect of inoculation with *Frankia* on the growth of *Alnus* in the field. Acta Ecologica 13:463-467.

22. Schwintzer, C. R. and J. D. Tjepkema 1990. The biology of *Frankia* and actinorhizal plants. Academic Press.

23. Su, H. and L. P. Lin 1989 The dissemination of endophytes and existence of endomycorrhiza on the rhizoplane of *Alnus formosana*. J. Chinese Agri. Chem. Soc. 27:515-523.

24. Tjepkema, J. D. and L. J. Winship 1980. Energy requirements for nitrogen fixation in actinorhizal and legume root nodules. Science 209:279-281.

25. Tzean, S. S. and C. L. Chu 1984 Ultrastructure and host-endophyte interactions in *Alnus formosana* root nodules. Proc. Natl. Sci. Council Part B. 8:210-221.

26. Tzean, S. S. and C. L. Chu 1985 Infectivity and nitrogen-fixing activity of *Frankia* isolated from nodules of *Alnus formosana*. Proc. Natl. Sci. Council Part B. 9:305-310.

27. Wang, W. Y. 1992 The isolation and study of symbiotic nitrogen fixing bacteria in Taiwan. In "Proceedings of the 1992 Joint International Symposium on Air Pollution, Soil Microbiology and Biotechnology of Forestry" C. H. Chiang and Y. N. Wang (eds.), Taipei, Taiwan, pp. 215-228.

表一、目前已知的放線根瘤植物所分布之科、屬及種類。

Family	Genus	No. of species
Betulaceae (樺木科)	*Alnus**	35
Casuarinaceae(木麻黃科)	*Allocasuarina*	54
	*Casuarina**	16
	Ceuthostoma	2
	Gymnostoma	18
Coriariaceae(馬桑科)	*Coriaria**	16
Datiscaceae(四數木科)	*Datisca*	2
Elaeagnaceae(胡頹子科)	*Elaeagnus**	38
	Hippophae	2
	Shepherdia	2
Myricaceae(楊梅科)	*Comptonia*	1
	*Myrica**	28
Rhamnaceae(鼠李科)	*Adolphia*	2
	Ceanothus	31
	Colletia	4
	Discaria	5
	Kentrothamnus	1
	Retanilla	2
	Talguenea	1
	Trevoa	2
Rosaceae(薔薇科)	*Cercocarpus*	4
	Chamaebatia	1
	Cowania	1
	Dryas	3
	Purshia	2
8 科	25 屬	273 種

* 原產或栽植於臺灣

表二、分離純化之固氮放線菌株及其宿主植物

中文名	學　名	分離株數
台灣赤楊	*Alnus formosana*	14
木賊葉木麻黃	*Casuarina equisetifolia*	28
山木麻黃	*Casuarina junghuhniana*	4
肯氏木麻黃	*Casuarina cunninghamiana*	7
銀木麻黃	*Casuarina glauca*	10
台灣馬桑	*Coriaria intermedia*	2
鄧氏胡頹子	*Elaeagnus thunbergii*	1
恒春楊梅	*Myrica adenophora* var. *kusanoi*	2
楊梅	*Myrica rubra*	3
共　計		71 株

表三、分離得到之固氮放線菌株，其採集地點在本省不同縣市之分布

縣市名	菌株數
台北市	3
台北縣	2
桃園線	1
新竹縣	1
苗栗縣	1
台中縣	6
彰化縣	2
台南縣	1
高雄縣	1
屏東縣	10
嘉義縣	2
宜蘭縣	7
花蓮縣	11
台東縣	1
澎湖縣	21
金門縣	1

表四、不同固氮放線菌株接種臺灣赤楊，其根瘤之固氮效率

菌 種	宿主植物	固氮效率 nM C_2H_2/g nodule/hr
Af-1	台灣赤楊	789.5
Af-2	台灣赤楊	400.8
Af-3	台灣赤楊	427.8
Af-4	台灣赤楊	245.9
Ce-1	木賊葉木麻黃	562.5
Ce-2	木賊葉木麻黃	694.0
Ce-3	木賊葉木麻黃	512.3
Ce-4	木賊葉木麻黃	952.2
Ce-5	木賊葉木麻黃	NT
Ce-6	木賊葉木麻黃	286.2
Ce-7	木賊葉木麻黃	1726.6
Cj-1	山木麻黃	186.4
Em-1	鄧氏胡頽子	41.4
Mr-1	楊梅	153.4
Mr-2	楊梅	144.4
平 均		508.8

討　論

花蓮區農改場黃山內場長問:

放射狀固氮菌與其它微生物之間互相作用如何? 如*Frankia*與或ectomycorrhiza之間協同作用是否有試驗資料?

林試所王維洋博士答:

以台灣赤楊來說, 根系中有*Frankia*, 外生菌根菌(*Lacarialacata*), 內生菌根菌(*Acaulospora* sp.等)一起共生, 協助台灣赤楊在極端脊劣土壤中生長, 至於其間共生依賴關係, 及與養分交換尙待進一步研究。國外報導赤楊(*Aluns rubra*)菌根中亦有*Azospirillum*存在, 進行協生(Associated) 固氮作用。

台中區農改場黃秀華問:

*Frankia*是否有專一性。

林試所王維洋博士答:

*Frankia*對宿主選擇是具有專一性, 一般而言可分成赤楊屬*Frankia*及木麻黃屬*Frankia*, 二個group間不易交互結瘤, 而胡頽子屬植物則具較廣之結瘤性, 可與上述兩個之*Frankia*結瘤。不同*Frankia*分離株之host range亦有差異。

The Study and Application of *Frankia* in Taiwan Forestry

Wei-Young Wang

Department of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute

Abstract

Frankia is a group of filamentous bacterium in the family of actinomycetaceae that can symbiotic growth with higher actinorhizal plants and fixing atmospheric nitrogen. *Frankia* is universally distributed and all of its hosts are woody species. About eight families with 25 genus and over 270 species of actinorhizal plants were recorded. There are five genus of actinorhizal plants grown in Taiwan. They are *Alnus, Casuarina, Coriaria, Elaeagnus* and *Myrica* with over 15 species of trees and shrubs. Nodules of hundreds of actinorhizal plants were collected around the island and used to isolate their *Frankia* endophytes. Currently, 71 *Frankia* pure cultures isolated from nine different host plants were obtained. This article briefly describe the actinorhizal plants occurred in Taiwan and the isolation, characteristics of *Frankia* cultures. The potential application of actinorhizal plants and *Frankia* in Taiwan forestry was also suggested.

Key words : *Frankia*, actinorhizal plants, symbiotic nitrogen fixation